FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

ANNEE 1968 N° 16

THESE

PRESENTEE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

PAR

HAUPTMANN Georges René

Né le 30 Novembre 1937 à Colmar (Haut-Rhin)

Ancien Externe des Hôpitaux de Strasbourg

Diplomé d'Hématologie

Attaché de Faculté

LA PREPARATION DE STROMAS DEPOURVUS D'HEMOGLOBINE

Président : R. WAITZ, Professeur.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552712_0013

FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

ANNEE 1968 N° 16

THESE

PRESENTEE POUR LE DOCTORAT EN MEDECINE

PAR

HAUPTMANN Georges René

Né le 30 Novembre 1937 à Colmar (Haut-Rhin)

Ancien Externe des Hôpitaux de Strasbourg

Diplomé d'Hématologie

Attaché de Faculté

LA PREPARATION DE STROMAS DEPOURVUS D'HEMOGLOBINE

Président : R. WAITZ, Professeur.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

FACULTE DE MEDECINE DE STRASBOURG

Doyen	MM. CLAVERT Jean
Doyens honoraires	CALLOT Jacques
	FONTAINE René
Assesseur	CALLOT Jacques

PROFESSEURS TITULAIRES

MM.	
ARON Claude	Histologie
BASSET André	Clinique dermatologique
BUCK Paul	Chirurgie infantile
CALLOT Jacques	Parasitologie
CHAMBRON Jacques	Physique biologique
CHAUMONT André	Médecine légale et sociale
CLAVERT Jean	Embryologie et Morphologie expérimentale
FONTAINE René	Clinique chirurgicale A
GANDAR Robert	Clinique Gynécologique et Obstétricale 1
GREINER Georges	Clinique Oto-Rhino-Laryngologique
GROS Charles	Electro-Radiologie
JUNG Adolphe	Chaire de Pathologie et Clinique Séméiologique Chirurgicales
KAMMERER Théophile	Clinique Psychiatrique
KAYSER Charles	Physiologie
KLEIN Marc	Biologie Médicale
KORITKE Jean-Georges	Anatomie Normale
LE GAL Yvon	Anatomie Pathologique
MANDEL Paul	Chimie Biologique
METZ Bernard	Physiologie appliquée
METZGER Henri	Thérapeutique
MINCK Raymond	Chaire de Bactériologie, Virologie et Immunologie Générale
MULLER Pierre	Clinique Gynécologique et Obstétricale 2
NORDMANN Jean	Clinique Ophtalmologique
OUDET Pierre	Pneumo-Phtisiologie

SACREZ Robert	Pédiatrie et Puériculture
SCHWARTZ Jean	Pharmacologie et Médecine expérimentale
STAHL Jules	Clinique Médicale B
STEPHAN Frédéric	Pathologie expérimentale
THIEBAUT François	Clinique Neurologique
VEDRINE Jean	Stomatologie
WAITZ Robert	Hématologie
WARTER Julien	Clinique Médicale A
WEISS Alfred	Clinique Chirurgicale B
N...	Hydrologie
N...	Hygiène

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

MM.

BRONNER Albert	Clinique Ophtalmologique
KARLI Pierre	Biologie Médicale
MARESCAUX Jean	Histologie
MARX Charles	Physiologie
MAYER Georges	Hématologie
ROHMER Francis	Clinique Neurologique
SEROR Joseph	Pathologie Chirurgicale
WINCKLER Georges	Anatomie

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

BATZENSCHLAGER André	Anatomie Pathologique
BOLLACK Claude	Clinique Chirurgicale A
BURGHARD Guy	Pneumo-Phtisiologie
DORNER Marc	Clinique Médicale B
KIRN André	Hygiène
LAVILLAUREIX Jean	Bactériologie
MANTZ Jean-Marie	Clinique Médicale A
MARCOUX François	Médecine Légale
WITZ Jean-Paul	Clinique Chirurgicale B

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

MM.	
ADLOFF Michel	Clinique Chirurgicale B
APROSIO Norbert	Anatomie
ASCH Léopold	Clinique Médicale
BLOCH Roger	Pharmacologie
BOCKEL René	Clinique Médicale B
BRINI Alfred	Clinique Ophtalmologique
CHAMBON Pierre	Chimie Biologique
EBTINGER René	Clinique Psychiatrique
FINCKER Louis	Clinique Médicale B
GAUTHIER-LAFAYE Pierre	Département d'Anesthésiologie
GRENIER Jacques	Clinique Chirurgicale B
HERAN Jacques	Pathologie expérimentale
ISCH François	Clinique Neurologique
ISRAEL Lucien	Clinique Psychiatrique
JAHN Henri	Clinique Médicale B
JUIF Jean	Pédiatrie et Puériculture
KEILING Roger	Electro-Radiologie
KELLER Bernard	Gynécologie et Obstétrique 2 (Maternité)
KEMPF François	Electro-Radiologie (Clinique Médicale A)
KEMPF Ivan	Pathologie Chirurgicale (Centre de Traumatologie)
KIENY René	Clinique Chirurgicale A
KREMER Michel	Parasitologie
LANG Gabriel	Hôpital Orthopédique Stéphanie
LEVY Jean-Marc	Pédiatrie et Puériculture
MALEVILLE Jean	Clinique Dermatologique
MAURER Charles	Clinique Médicale B
Mme MAYER Simone	Hématologie
PHILIPPE Emile	Anatomie Pathologique
ROEGEL Emile	Pneumo-Phtisiologie
ROHMER Albert	Institut de Puériculture
SACREZ André	Clinique Médicale A
SCHAFF Georges	Physiologie

SCHNEEGANS Ernest	Pédiatrie et Puériculture
SCHVINGT Eugène	Clinique Chirurgicale B
SIBILLY Abel	Clinique Chirurgicale A
VERGNES René	Physique Biologique
VINCENDON Guy	Chimie Biologique
VOEGTLIN Raymond	Clinique Médicale A
WACKENHEIM Auguste	Electro-Radiologie (Clinique Neurologique)
WALTER Jean-Pierre	Electro-Radiologie
WARTER Pierre	Electro-Radiologie (Clinique Chirurgicale A)
WEILL Jean-Pierre	Clinique Médicale A
WILLARD Daniel	Pédiatrie et Puériculture

PROFESSEUR ASSOCIE

M. PHILIPPIDES Demètre	Clinique Neurologique

A G R E G E S

MM.	
CHAMPY Maxime	Stomatologie
FRANK Robert	Stomatologie
KLOTZ Gilbert	O.R.L.
MEHL Jacques	Médecine Légale

AGREGES LIBRES

MM.	MM.
BEYER Paul	KUHLMANN Daniel
FORSTER Emile	KUNTZMANN Jean
HOLLENDER Louis	MULLER Jean-Nicolas

DIRECTEUR DE L'INSTITUT DENTAIRE

M. le Professeur VEDRINE Jean

CHARGES D'UN COURS D'ENSEIGNEMENT COMPLEMENTAIRE

MM. MOISE, SINGER, TISSIER

SECRETAIRE PRINCIPAL DE LA FACULTE DE MEDECINE

M. Gilbert KIEHL

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. ARON Max
BURGER Paul
BENOIT Jacques
ROEDERER Jean
ROHMER Paul
SCHMID Frédéric
THIODET Jean
VINTEMBERGER Pierre

La Faculté a arrêté que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ni les approuver, ni les improuver.

SERMENT D' HIPPOCRATE

En présence des maîtres de cette école, de mes chers condisciples, je promets et je jure au nom de l'Etre Suprême d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine. Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe.

Ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser les crimes.

Respectueux et reconnaissant envers mes maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis resté fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

A mon Maître et Président de Thèse

Monsieur le Professeur R. WAITZ

qui a bien voulu m'accueillir à l'Institut d'Hématologie

qui m'a initié à l'étude approfondie de l'Hématologie tout en formant mon esprit médical

qui m'a donné l'idée de cette thèse en m'aidant à la réaliser par ses directives fondées sur son expérience et sa très grande érudition.

En témoignage de mon admiration et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur G. MAYER

et Madame S. MAYER

Professeur Agrégé à la Faculté de Médecine de Strasbourg

qui n'ont cessé de m'encourager dans mon travail et auprès desquels j'ai toujours trouvé un appui scientifique et moral des plus efficaces.

Qu'ils veuillent bien trouver ici l'hommage de mes sentiments respectueux et particulièrement reconnaissants.

A Monsieur J. MALGRAS

Professeur Agrégé à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

qui n'a cessé de me témoigner le

plus bienveillant intérêt

A Monsieur le Docteur J. LEWIN

qui a bien voulu s'intéresser à

ce travail et me faire bénéficier de ses

conseils techniques éclairés.

A tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail

Madame le Docteur L. RODIER

Madame D. WEILL

Mademoiselle M.L. NORTH

Monsieur J.J. ZORN

Le personnel de l'Institut d'Hématologie et du

Centre de Transfusion Sanguine de Strasbourg

Nous tenons à remercier particulièrement

Madame A. DUVAL

pour sa précieuse collaboration.

A mon père décédé

A ma mère

En témoignage de mon affection et de ma gratitude

A ma famille

A mes amis.

I N T R O D U C T I O N

L'hémolyse permet de soustraire aux globules rouges leur contenu riche en hémoglobine. On obtient ainsi un "résidu post-hémolytique", qui n'est pas exactement une membrane, et que l'on appelle stroma.

De nombreuses techniques de préparation de stromas ont été décrites, mais la plupart des auteurs n'ont pas réussi à éliminer toute l'hémoglobine, puisque les conditions d'obtention de stromas dépourvus d'hémoglobine étaient méconnues.

Après avoir rappelé l'essentiel des connaissances concernant la composition chimique et l'ultrastructure du stroma érythrocytaire, nous exposerons le problème de la relation de l'hémoglobine avec le stroma et préciserons les conditions nécessaires à l'obtention de stromas dépourvus d'hémoglobine.

Nous décrirons une méthode permettant de préparer des stromas pratiquement exempts d'hémoglobine à partir de 300 à 350 ml de sang.

COMPOSITION CHIMIQUE DU STROMA ERYTHROCYTAIRE.

L'analyse chimique des stromas montre qu'ils sont constitués par une association complexe de lipides, de protéines, de mucopolysaccharides auxquels il faut également ajouter des enzymes, des nucléotides libres et des acides aminés libres.

I. COMPOSITION LIPIDIQUE.

Grâce aux progrès récents réalisés dans l'étude des lipides et en particulier la mise au point de techniques de fractionnement nouvelles, la composition lipidique du stroma est actuellement bien connue.

Un point semble bien établi: à savoir que tous ou presque tous les lipides du globule rouge sont retrouvés dans les stromas:

- ERICKSON, WILLIAMS, BERNSTEIN, ARVIN et MACY (33) ont comparé la teneur en lipides des cellules intactes à celle de stromas dépourvus d'hémoglobine de globules rouges humains, de bovins, d'ovins et de cheval obtenus par lavages dans l'eau saturée en CO^2: moins de 10 % de lipides ont été perdus au cours de l'hémolyse et des lavages.

- ANDERSON et TURNER (2) également ont observé moins de 10 % de pertes dans des stromas contenant cependant encore de l'hémoglobine.

Le fait que presque tous les lipides sont retrouvés dans les stromas prouve que ces lipides sont fortement liés à la membrane.

Certains auteurs ont cependant noté des pertes en phospholipides et en cholestérol en lavant des globules rouges humains hémolysés dans des solutions de NaCl ce qui indiquerait que ces composants sont moins étroitement liés à la cellule. Les résultats de divers auteurs sont contradictoires:

- LOVELOCK (50) trouve des pertes de l'ordre de 15 %

- DAWSON et coll. (27) hémolysant des globules rouges dans l'eau distillée, observent des pertes en phospholipides d'environ 41 %.

- BRUN (17) par contre, n'a pas constaté de pertes en cholestérol ou en phospholipides même après des lavages répétés.

Apparemment les méthodes de préparation de stromas jouent un rôle important dans la conservation des lipides. Les effets du pH et de la force ionique de la solution hémolysante et des solutions de lavage ont été étudiés de façon détaillée par DODGE, MITCHELL et HANAHAN (30). Ces auteurs ont pu définir les conditions optimales pour la préparation de stromas entièrement dépourvus d'hémoglobine: hémolyse des globules rouges et lavages dans une solution 20 milliosmolaire à pH 7,4. Dans ces conditions 95 % au moins des lipides du globule rouge intact sont retrouvés dans les stromas.

- WEED, REED et BERG (93) utilisant une technique de préparation comparable, ont obtenu des résultats identiques: pertes d'environ 5 % seulement.

Le contenu total en lipides du globule rouge est d'en-

viron 5 à 5,5 mg par ml de globules rouges: ce contenu est donc assez faible si on le compare à la teneur en hémoglobine qui est de 350 mg par ml de globules rouges.

Le plasma et les globules rouges ont la même teneur en lipides mais les globules rouges sont plus riches en phospholipides et contiennent moins de cholestérol.

Le tableau ci-dessous résume la distribution des différents types de lipides contenus dans les stromas:

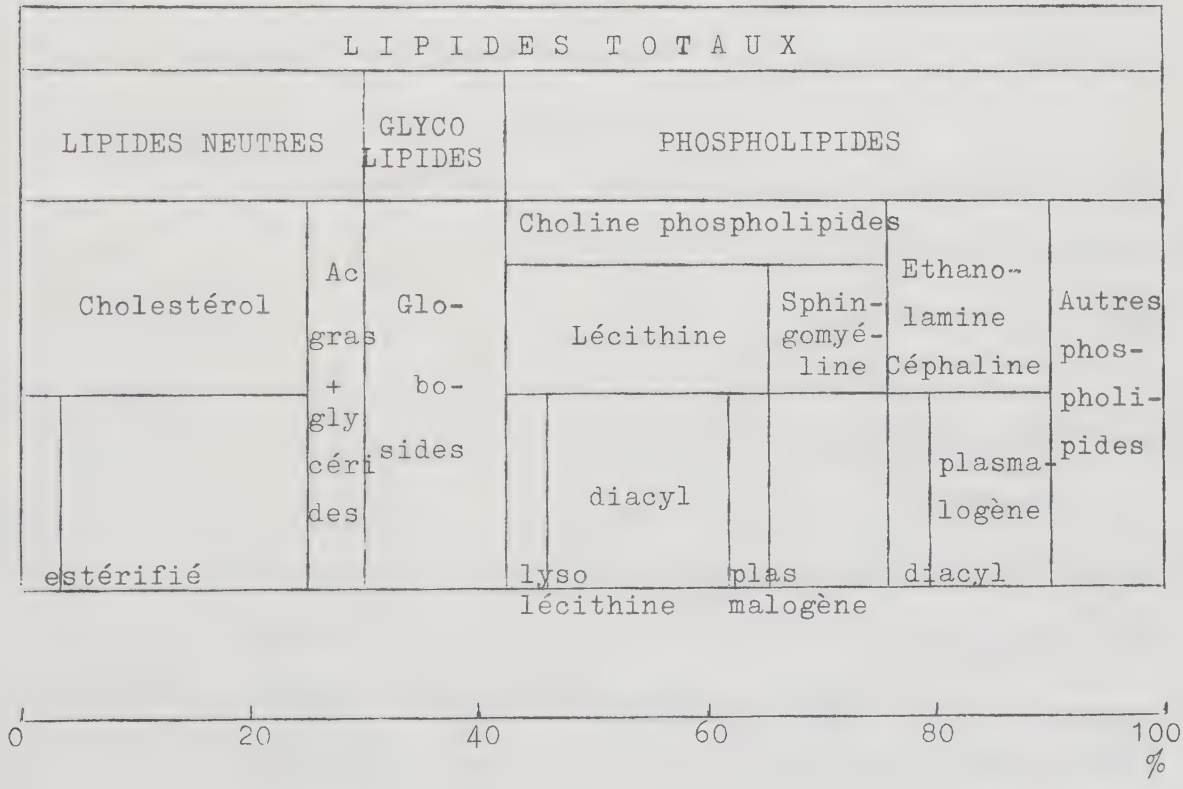


Schéma de VAN DEENEN et DE GIER (90)

1. Lipides neutres.

Ils représentent environ 27 % du contenu total en lipides. Il s'agit essentiellement du cholestérol libre et d'une petite fraction de cholestérol estérifié, de quelques acides gras libres et de triglycérides. Les globules rouges, contrairement au plasma, ne contiennent pratiquement que du cholestérol libre et seulement une petite fraction de cholestérol estérifié. Le cholestérol est un constituant structural important de la membrane.

2. Glycolipides.

Ce sont les lipides contenant des hydrates de carbone. On peut en distinguer trois groupes:

a) un groupe formé de -cérébrosides (céramide monohexosides) = association molaire de sphingosine + acide gras + hexose (glucose ou galactose).
-céramide oligohexosides contenant un nombre plus élevé d'hexoses.

b) un second groupe formé de composés analogues aux précédents mais contenant différentes proportions d'hexosamines (glucosamine ou galactosamine).
YAMAKAWA et coll. (99) ont isolé des stromas lyophilisés de globules rouges humains un glycolipide appartenant à ce groupe et qu'ils ont appelé "globoside". Il s'agit essentiellement d'un lignocerylsphingosine acétylgalactosamine trihexoside.

Ce groupe de "globosides" comporte plusieurs fractions dont deux possèdent des activités de groupe sanguin A B O (99).

Les glycolipides représentent 2 % du poids sec des stromas soit environ 10 % du contenu total en lipides. Ils ont été extraits de stromas lyophilisés par le mélange chloroforme/méthanol 1/1 à chaud après extraction préalable des lipides neutres et des phospholipides par l'acétone et l'hexane.

J. KOSCIELAK (46) a confirmé la nature lipidique des substances de groupe A B O de la membrane érythrocytaire. Les connaissances concernant la nature chimique des substances de groupe A B O ont été acquises grâce à l'étude de mucopolysaccharides présents dans les sécrétions (MORGAN 56; KABAT 43). Les substances de groupe extraites des globules rouges avaient été peu étudiées en raison de la faible teneur de ces composés dans la membrane. KOSCIELAK a pu obtenir 10 à 20 mg seulement de substance purifiée à partir de 20 à 30 litres de culot globulaire. D'autre part, la nature lipidique de ces extraits leur confère des propriétés sérologiques particulières: en effet, l'activité sérologique dépend du mode de dispersion de cet "antigène lipidique" dans un milieu aqueux et de la présence d'autres lipides. Lorsque ces lipides associés sont éliminés au fur et à mesure de la purification, l'activité de groupe A B O des extraits de globules rouges diminue. On ne peut donc pas obtenir un extrait pur possédant une activité sérologique élevée.

KOSCIELAK a extrait de stromas de globules rouges A et B deux glycolipides de structure analogue aux "globosides" de

YAMAKAWA. Ces glycolipides sont solubles dans l'eau, le méthanol chaud, le mélange chloroforme/méthanol. Ils sont insolubles dans l'éther, le chloroforme et le benzène. Toutes les fractions possédant une activité de groupe contiennent des résidus de glucose, de galactose, de glucosamine, de galactosamine, de fucose, d'acide sialique, de sphingosine et d'acides gras. La présence d'acides aminés n'a pas pu être détectée; ainsi la fraction glucidique des substances de groupe A B O des globules rouges est liée à des lipides et non à des peptides. Le poids moléculaire de ces glycolipides n'est pas encore connu. Leur constante de sédimentation à l'ultracentrifugation varie selon leur concentration (11,9 S à 0,62 %; 64 S à 0,9 %) ce qui indique que ces lipides se comportent en milieu aqueux comme des macromolécules.

3. Phospholipides.

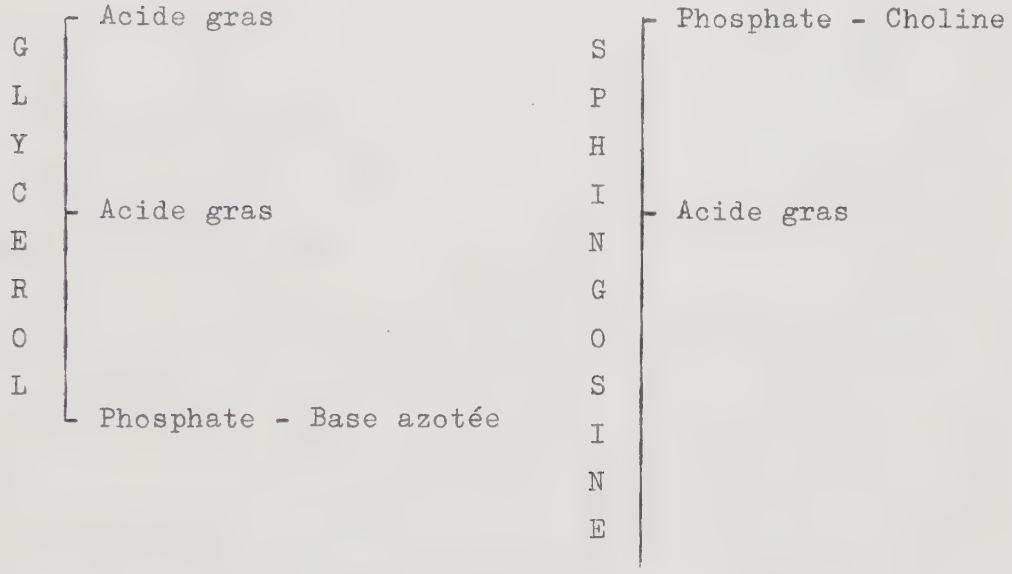
Ces lipides contiennent dans leur molécule un ou plusieurs groupes "phosphate" et constituent la fraction lipidique la plus importante du globule rouge. Le contenu en phospholipides est calculé d'après la teneur en phosphore des extraits lipidiques purifiés. Les phospholipides contiennent en effet en moyenne 4 % de phosphore. On peut également séparer les phospholipides des autres lipides par chromatographie (acide silicique en colonne).

Les phospholipides représentent environ 60 % des lipides des stromas. Ils jouent un rôle structural important dans la membrane du fait de leur constitution particulière: longue chaîne hydrocarbonée hydrophobe avec un groupement polaire hydrophile.

On distingue essentiellement deux types principaux:

- l'un contenant du glycérol: glycérol-phospholipides ou glycérophosphatides.
- l'autre contenant la sphingosine: la sphingomyéline.

Le type glycérol comporte deux longues chaînes d'acides gras, le type sphingomyéline seulement une.



Trois des plus importants phospholipides du globule rouge contiennent du glycérol et diffèrent seulement par leur base azotée qui est soit:

- la choline = phosphatidylcholine ou lécithine
- la sérine = phosphatidylsérine) ces deux composés
- l'éthanolamine = phosphatidyléthanolamine) forment la "céphaline".

Le seul phospholipide du globule rouge contenant de la sphingosine est la sphingomyéline.

Les autres phospholipides trouvés dans le globule rouge sont:

- l'acide phosphatidique qui est un intermédiaire dans la biosynthèse des phospholipides.
- les inositol-phosphatides: monophosphoinositide
  diphosphoinositide
- des dérivés monoacyl (une seule chaîne d'acides gras) appelés lysophospholipides, en particulier la lysolécithine.

Voici un tableau de la composition en phospholipides des stromas de globules rouges humains donné par R. WHITTAM (95) d'après les valeurs fournies par PHILIPS et ROOME (68), DAWSON et coll. (27), REED et coll. (83), DE GIER et DEENEN (28), PARPART et DZIEMIAN (64).

Les chiffres indiquent le pourcentage par rapport au contenu total en phospholipides.

	%
Lécithine	30
Lysolécithine	2,5
Phosphatidyléthanolamine*	25
Phosphatidylsérine*	15
Sphingomyéline	22
Phosphoinositide	1,6
Acide phosphatidique	4

* ces deux composés forment la "céphaline".

Une partie des phospholipides du globule rouge appartient à la classe des plasmalogènes ou acétalphosphatides. Ces composés contiennent une liaison éther non saturée au lieu d'une liaison ester. Les globules rouges humains sont riches en plasmalogènes tandis que ceux du cobaye, du lapin en contiennent

beaucoup moins. FARQUHAR (35) a établi que 67 % des phospholipides à base d'éthanolamine et 10 % de la phosphatidylcholine (lécithine) appartiennent à ce type.

Les phospholipides contiennent dans leur molécule une ou deux chaînes d'acides gras. Ces acides gras peuvent être séparés de la molécule et être étudiés par chromatographie gazeuse. Chaque phospholipide contient 6 à 8 acides gras différents (FARQUHAR 35, WAYS et HANAHAN 92). La distribution en acides gras est particulière à chaque sorte de phospholipide. Ainsi la lécithine est très riche en acide linoléique; la phosphatidylsérine est riche en acide arachidonique. Dans le groupe phosphatidyl-éthanolamine on trouve avant tout de l'acide stéarique et arachidonique; dans la sphingomyéline l'acide palmitique prédomine.

La composition lipidique du stroma est donc assez complexe. Il est essentiel de considérer, de plus, que ces lipides se comportent de façon dynamique en interférant continuellement avec ceux du plasma.

Le tableau suivant indique le pourcentage d'échange en l'espace de 12 heures (% fractional turnover per 12 hours) pour différents types de lipides. Il faut surtout noter l'importance des échanges en cholestérol entre globule rouge et plasma.

Lipides	% fractional Turnover per 12 Hours
Cholestérol	85-100
Phosphatidyl choline	7
Sphingomyéline	4
Phosphatidyl sérine	-
Phosphatidyl éthanolamine	< 1

WEED et REED (94)

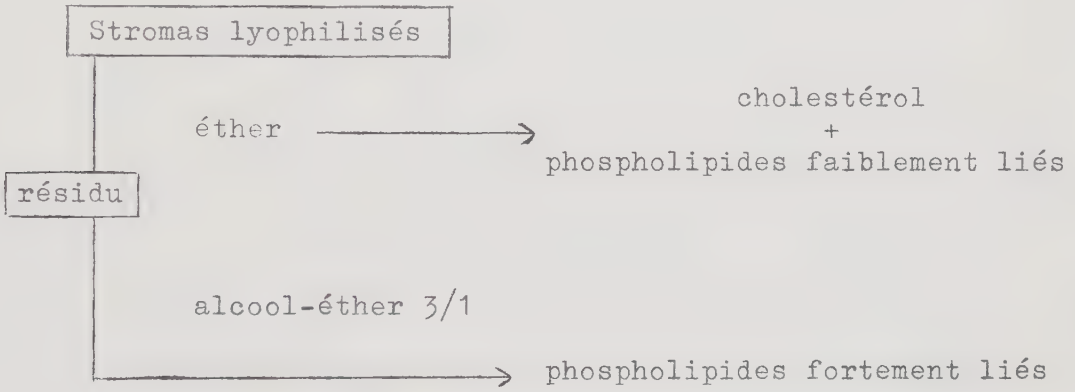
Liaison des lipides avec les autres constituants du stroma.

Il est presque évident que les différentes classes de lipides sont liées entre elles au sein du stroma et reliées d'autre part aux protéines pour former des complexes lipoprotéiniques.

La nature lipoprotéinique des stromas est reconnue depuis longtemps et résulte de l'interaction des groupements polaires des phospholipides et des protéines.

PARPART et BALLENTINE (66) les premiers ont mis en évidence l'existence de liaisons de force variable entre les lipides et les protéines, en étudiant l'action de divers solvants. Le traitement des stromas par l'éther pur détache tout le cholestérol et une petite fraction de phospholipides (céphaline): ce sont des lipides faiblement liés. D'autres solvants tels que l'éther dilué, la pyridine-éther, détachent une autre partie de phospholipides, moyennement liés. Finalement, la plus grande partie des phospholipides n'est extraite que par des solvants des groupements polaires (alcool-éther 3/1) et ces phospholipides

sont considérés comme étant fortement liés. Des études semblables effectuées par VAN DEENEN et coll. (cité dans 90) sur des stromas de globules rouges d'espèces variées ont confirmé ces résultats à savoir l'existence de lipides faiblement et fortement liés. Comme l'avaient montré PARPART et BALLENTINE, l'éther permet d'extraire tout le cholestérol et une petite partie de phospholipides (21 % chez l'homme - céphaline surtout). La fraction fortement liée est extraite par le mélange alcool-éther 3/1.



(VAN DEENEN 89).

PARPART et BALLENTINE (66) ont déduit de leurs observations que les lipides fortement liés sont ceux combinés aux protéines tandis que les lipides faiblement liés sont rattachés aux chaînes d'acides gras des phospholipides. Dans leur conception de la structure de la membrane, les lipides sont groupés sous forme de cylindres de phospholipides et de cholestérol entourés de protéines. Il s'agirait d'une structure "en mosaïque".

DOURMASHKIN et coll. (31, 32) ont étudié au microscope

électronique l'action de la saponine sur la surface des stromas. A certaines concentrations, le traitement par la saponine fait apparaître un aspect hexagonal de creux ou puits tandis que la digitonine empêche la formation de ces "puits". Ceci confirmerait l'hypothèse de PARPART et BALLENTINE puisque ces "puits" correspondraient à l'arrangement des lipides sous forme de cylindres. Il n'est cependant pas certain que ces structures hexagonales existent: il pourrait s'agir d'artéfacts de préparation.

Associations entre les lipides.

Toutes les théories émises sur la structure de la membrane globulaire admettent l'existence de liaisons entre les parties non polaires des lipides. Il est remarquable de constater que dans les stromas de globules rouges de mammifères le rapport entre le taux moléculaire de cholestérol et de phospholipides est voisin de 1.

L'étude de l'interaction du cholestérol et des phospholipides dans des couches monomoléculaires a montré que le cholestérol avait la propriété de resserrer les molécules de phospholipides puisqu'on observe une diminution de l'aire moléculaire occupée par les phospholipides (DERVICHIAN 29).

II. COMPOSITION PROTIDIQUE.

7 à 14 % du total des protéines contenues dans le globule rouge sont "d'autres protéines que l'hémoglobine" (PONDER 73).

Contrairement aux lipides, les protéines des stromas ont été mal individualisées jusqu'à présent. Le nombre de protéines présentes en tant que composés structuraux n'a pas encore été clairement établi, bien qu'elles constituent environ 90 % du poids sec de la membrane selon PARPART (64). De nombreuses nomenclatures ont été proposées surtout par le fait que des procédés d'isolement très variés ont été utilisés.

La première étude des protéines des stromas a été effectuée par JORPES (42). Après hémolyse de globules rouges de mouton, de cheval par l'eau distillée, l'auteur a précipité les stromas en ajoutant de l'acide chlorhydrique jusqu'au pH 5,5. La préparation contenait cependant 14 à 30 % d'hémoglobine. . Après extraction des lipides par le mélange alcool/éther, il obtenait une protéine qu'il a appelée "Stromatine" et qu'il considérait comme une protéine "sui generis" pour sa composition en acides aminés.

BALLENTINE (6) également a isolé la stromatine. Considérant la méthode de préparation, on estime que la stromatine est une protéine dénaturée.

Une étude plus complète des protéines des stromas a été réalisée par MOSKOWITZ et CALVIN (59). Ces auteurs ont fait des essais de fractionnement des protéines des stromas dans le but d'obtenir un extrait concentré de substance Rhésus. Ils ont

d'abord essayé de se débarasser de l'hémoglobine. Dans un premier temps, MOSKOWITZ et CALVIN lavaient les stromas dans de l'eau puis dans une solution alcaline à pH 9. Dans un deuxième procédé, après hémolyse, les stromas étaient sédimentés et lyophilisés. La préparation lyophilisée était d'abord lavée à l'eau pure puis avec une solution alcaline à pH 9,0 jusqu'à l'obtention d'un surnageant incolore. Le matériel obtenu par cette préparation a été appelé "réticuline" ou "stromine" et considéré comme étant la trame protéique de la membrane. La Stromine a été ensuite fractionnée par l'éther ce qui a permis l'isolement d'une phospholipoprotéine appelée "Elinine". Du surnageant ou fraction soluble on peut extraire une autre protéine en ajustant le pH à 6,4, la protéine "S".

Il s'est avéré que l'Elinine contenait les substances de groupe A, B et Rh. Par contre la protéine "S" est dépourvue de toute activité de groupe sanguin. L'Elinine est une protéine de caractère fibrillaire et possède un poids moléculaire de 40×10^6. Elle est soluble dans l'eau et forme un gel à une concentration supérieure à 5 %. Elle contient des hydrates de carbone. Une solution à 1 % présente une forte biréfringence ce qui traduit une structure moléculaire fortement orientée. Au microscope électronique elle se présente sous forme de particules allongées de 5 à 11 de long et 0,3 à 1,3 de large.

MOSKOWITZ et CALVIN (59) ont émis l'hypothèse que les molécules d'Elinine étaient allongées parallèllement à la surface du globule rouge et reliées à la protéine "S" par des

lipides. L'assemblage de la protéine "S", des lipides et de l'Elinine formerait la trame protéique de la membrane c'est à dire la stromatine.

Electrophorèse et étude chromatographique des protéines du stroma.

Les études à ce sujet sont peu nombreuses en raison surtout de l'insolubilité des protéines des stromas.

- STERN (87) en 1945 a étudié par électrophorèse des lysats de globules rouges d'homme, de chien et de poussin. A côté de l'hémoglobine, STERN a décrit deux fractions: une fraction a migrant vers l'anode plus rapidement que l'hémoglobine, une fraction b moins rapide qui est présente dans les hémolysats de globules rouges d'homme et de chien.
- PEROSA et RACEUGLIA (67) en 1952 ont décrit par chromatographie sur papier quatre fractions protéiques contenant des lipides.
- PRANKERD, ALTMANN et ANDERSON (80), par électrophorèse sur papier, ont séparé trois fractions contenant également des lipides.
- AZEN, ORR et SMITHIES (4, 5) récemment, ont mis au point une technique complexe d'électrophorèse de stromas en gel d'amidon. Après extraction des lipides, qui est absolument nécessaire pour obtenir une bonne séparation électrophorétique des diverses fractions protéiques, les protéines du stroma sont partiellement solubilisées par l'urée et le mercaptoéthanol en milieu alcalin. En plus de l'hémoglobine résiduelle (fraction a) on obtient 5 autres fractions: b, c, d, e et f (qui se subdivise en 4 à 5

sous fractions). Selon les auteurs, certaines de ces fractions pourraient correspondre à des enzymes contenus dans la membrane. L'analyse d'un nombre élevé de stromas provenant de sujets d'âge et de race différents a donné des résultats constants et identiques. Des études sont en cours concernant les modifications éventuelles de ces fractions dans des états pathologiques ainsi que l'existence possible de variations génétiques.

Au total, la composition protidique des stromas reste encore confuse en raison des méthodes très variables d'isolement et de l'association très intime des protéines et des lipides. Des progrès plus importants seront réalisés dans ce domaine lorsqu'on réussira à solubiliser plus complètement les protéines du stroma après extraction des lipides.

III. MUCOPOLYSACCHARIDES.

Ce sont des glycoprotéines solubles dans l'eau, extraites des stromas de globules rouges par le phénol qui ont été particulièrement étudiées par KLENK et UHLENBRUCK (45). Ces "mucoïdes" comparables aux glycolipides possèdent une activité de groupe sanguin M et N. Ils se composent de 7,4 % d'azote, 20,8 % de glucides, 6,7 % d'aminoglucides et 15,3 % d'acide N-acétyl neuraminique. L'acide neuraminique est une substance biologique très intéressante: il détermine l'activité de groupe M et N; cette activité est supprimée sous l'action d'un enzyme, la neuraminidase. Comme dans les glycolipides, on trouve dans ces glycoprotéines du galactose, de la glucosamine, de la galactosamine et des traces de fucose et de mannose.

IV. NUCLEOTIDES LIBRES.

Les nucléotides libres des globules rouges ont été étudiés par P. MANDEL et coll. (51). On trouve dans les globules rouges des nucléotides de l'adénine (AMP, ADP et ATP) ainsi que des nucléosides mono, di et triphosphates de la guanine, l'uridine diphosphate glucose et glucosamine également des monophosphates de la cytosine et de l'uracile. Les nucléotides libres se trouvent à un taux très élevé dans les réticulocytes et diminuent avec l'âge des globules rouges; il n'est pas précisé dans quelle proportion ces composants existent dans les stromas: ces nucléotides sont extraits de lysats de globules rouges.

V. LES ENZYMES CONTENUS DANS LES STROMAS.

Les globules rouges sont extrêmement riches en enzymes dont certains sont contenus en totalité dans la membrane;

- l'adénosine triphosphatase (WEED, REED et BERG 93; CLARKSON et MAIZELS 21; CAFFREY et coll. 19; BARTLETT 7).
- les enzymes du cycle de l'acide phosphatidique: phosphatidic acid phosphatase et diglycéridekinase (HOKIN et HOKIN 40).
- les facteurs responsables du transport du Sodium et du Potassium résident exclusivement dans les stromas (POST et ALBRIGHT 79). Leur activité est en grande partie identifiée avec celle de l'adénosine triphosphatase; elle est en tous cas indépendante du contenu en hémoglobine et persiste dans les stromas entièrement dépourvus d'hémoglobine (WEED, REED et BERG 93).

D'autres activités enzymatiques spécifiques des stromas

sont:

- l'acétylcholinestérase (LAUF et POULIK 48), la catalase, la triose phosphate déhydrogénase, la DPNase; une nucléoside phosphorylase (PRANKERD 81).
- un activateur de la glucose 6 phosphate déhydrogénase a été isolé de stromas (RAMOT et coll. 82).

Des enzymes qui prédominent dans la partie interne du globule rouge mais qui ont été retrouvés également dans des stromas soigneusement préparés et lavés comprennent:

- l'aldolase (MITCHELL, MITCHELL et HANAHAN 53)
- la glycéraldéhyde 3 phosphate déhydrogénase, la lactate déhydrogénase (ou lactico déhydrogénase (1,4 % de l'activité totale seulement WEED, REED et BERG 93); acide 1-3 phosphoglycérique kinase, phosphoriboisomérase, phosphoketopentose épimérase et transketolase (SCHRIER 85).

ULTRASTRUCTURE DU GLOBULE ROUGE.

Très longtemps les hypothèses sur la constitution du globule rouge ont varié entre ces deux conceptions extrêmes:

1° Le globule rouge est une vésicule limitée par une membrane et renfermant une solution d'hémoglobine.

2° Le globule rouge ressemble à une éponge dont les mailles contiennent l'hémoglobine plus ou moins combinée au stroma.

La structure qui cadre le mieux avec les faits connus semble être d'un modèle intermédiaire: la trame lipoprotéique formant le stroma serait condensée à la périphérie mais peu abondante au centre; l'hémoglobine existerait dans toutes les fractions du stroma mais en plus ou moins grande quantité: à la périphérie elle serait très peu abondante et partiellement liée au composant lipoprotéique, au centre, elle serait sous forme de solution concentrée.

1) Ultrastructure superficielle.

Nos connaissances sont basées sur l'étude des propriétés physiques de la membrane des globules rouges (propriétés électriques et optiques) et leur image au microscope électronique.

- Propriétés électriques: une suspension de globules rouges en milieu physiologique placée dans un champ électrique montre une migration des cellules vers l'anode. Les globules rouges possèdent donc à leur surface une charge électrique négative. Les groupements chargés de la surface globulaire sont étroitement reliés à elle puisque diverses modifications de la cellule

n'affectent pas leur mobilité électrophorétique. La vitesse de migration ne dépend pas de la forme de la cellule puisque les sphérocytes, les cellules falciformes migrent de la même façon. Des stromas obtenus par congélation-décongélation conservent également leur mobilité électrophorétique (PONDER et PONDER 77). La nature chimique de la charge électro-négative de la surface globulaire a été clairement établie: elle est due aux groupements carboxyles de l'acide sialique présent à la surface sous forme d'un sialomucopeptide (EYLAR, MADOFF, BRODY et ONCLEY 34; COOK, HEARD et SEAMAN 23; COOK 22). L'acide sialique est un constituant des mucopolysaccharides et des mucoprotéines. EYLAR et coll. concluent à l'existence d'une couche de mucoprotéines à la surface de l'hématie.

- Polarisation optique: SCHMITT, BEAR et PONDER (84) ont découvert la biréfringence des stromas de globules rouges de lapin. Cette propriété a été rattachée à l'arrangement réciproque des molécules lipidiques et protidiques: les protéines seraient disposées tangentiellement et logeraient dans leurs mailles des micelles lipidiques orientées radialement.

- Etudes au microscope électronique: WOLPERS en 1942 (98) a observé les stromas de globules rouges au microscope électronique mais une étude plus poussée a été réalisée par HILLIER et HOFFMANN en 1953 (38) et HOFFMANN en 1958 (39). Ces auteurs ont décrit des structures grossièrement arrondies d'un diamètre variant de 100 à 400 Å, visibles à la surface des stromas. Entre ces structures appelées "plaques" il y a des ouvertures d'envi-

ron 30 Å de diamètre appelées "pores". On considère les plaques comme étant des masses de lipoprotéines disposées en une couche unique et reposant sur une matière de nature fibrillaire, une "doublure interne", dont les fibres sont orientées tangentiellement. En effet, en faisant agir sur les stromas un mélange d'alcool-chloroforme-éther, les plaques disparaissent de la surface en laissant en évidence une structure fibrillaire. Les plaques ne seraient rien d'autre que l'élinine, la doublure interne la protéine "S". WOLPERS (97) a obtenu des images similaires. DANON, NEVO et MARIKOVSKY (25) décrivent la surface comme étant simplement granuleuse ainsi que BUNDHAM, WRIGHT (18) et DOURMASHKIN (31).

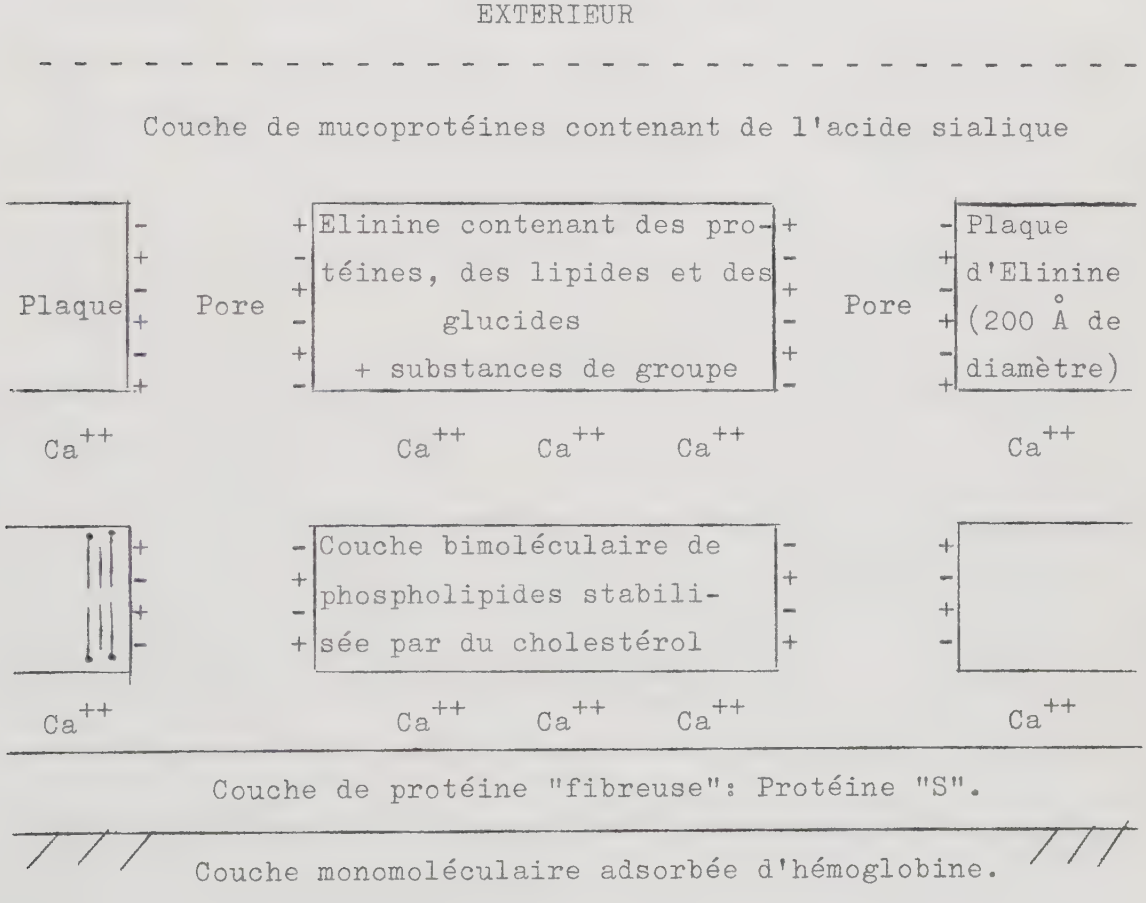
2) Ultrastructure interne.

L'idée que les couches superficielles du globule rouge entourent une solution d'hémoglobine n'est plus soutenable connaissant les résultats de l'analyse aux rayons X de la partie interne faite par DERVICHIAN (29). Cette analyse montre que les molécules d'hémoglobine ne sont pas libres comme elles le seraient dans une simple solution mais que chacune est associée avec ses environs immédiats pour former un petit groupement: la "short-ordered structure".

3) Conception d'ensemble sur la structure de la membrane.

Le schéma ci-dessous indiqué par R. WHITTAM (95) tente de donner une représentation de la structure de la membrane globulaire. Il tient compte des résultats des analyses chimiques et physiques de la membrane, en particulier de:

- la double biréfringence
- la structure hétérogène révélée par le microscope électronique
- la présence d'une protéine de caractère fibrillaire
- la présence d'une couche bimoléculaire de lipides.



= phospholipide avec son groupement polaire

= cholestérol

L'hypothèse la plus généralement admise aujourd'hui quant à la structure de la membrane globulaire fait donc intervenir l'existence de plusieurs couches; de la périphérie vers le centre de l'hématie se trouveraient successivement:

- une couche externe de mucoprotéine riche en acide sialique (responsable de la charge électrique négative des hématies).
- une couche formée par des plaques d'élinine combinée à certains lipides et aux substances de groupes sanguins.
- une couche bimoléculaire de phospholipides dont l'arrangement serait stabilisé par du cholestérol et qui s'opposeraient molécule à molécule par leurs groupements polaires.
- une couche constituée par la protéine "S" sur laquelle serait adsorbée
- une couche monomoléculaire d'hémoglobine pratiquement indissociable de la membrane.

Certaines couches seraient séparées par du calcium ionisé, le calcium jouant le rôle de "ponts" entre les charges négatives voisines des protéines et des phospholipides.

RELATION DE L'HEMOGLOBINE AVEC LA MEMBRANE - PROBLEME DE L'HEMOGLOBINE RESIDUELLE.

Deux points de vue opposés coexistent encore à l'heure actuelle quant au problème de la relation de l'hémoglobine avec la membrane:

1° L'hémoglobine est un composé structural de la membrane formant un complexe avec les protéines de la surface du globule rouge.

2° L'hémoglobine n'est pas un composé structural essentiel de la membrane: l'hémoglobine résiduelle trouvée dans les stromas n'est qu'un contaminant (idée défendue par PARPART et son école).

A l'appui de la première hypothèse, M. BESSIS et coll. (13) ont montré que les formes myéliniques (appelées hématexodies à leur découverte par R. WAITZ 91) dérivées des cellules falciformes de la drépanocytose contiennent l'hémoglobine anormale S. "Chez les malades atteints de drépanocytose, les érythrocytes donnent naissance, en milieu oxygéné, à des formes myéliniques exactement semblables à celles qui proviennent des globules rouges normaux. Mais lorsque le milieu est réduit, les formes myéliniques, celles qui sont attachées au globule rouge, comme celles qui nagent librement dans le milieu, se rigidifient et prennent l'aspect de bâtonnets rectilignes ou souvent en forme de V élargi. Cette rigidification réversible indique probablement la présence d'hémoglobine dans les formes myéliniques que l'on doit donc considérer comme de petits fragments de la surface

érythrocytaire contenant phospholipides et hémoglobine". (M. BESSIS 15).

PONDER (70), ANDERSON et TURNER (1) estiment qu'une faible quantité d'hémoglobine est liée à l'ultrastructure superficielle du globule rouge. Ces auteurs affirment qu'il est impossible de soustraire la totalité de l'hémoglobine aux stromas sans entraîner des pertes importantes en protéines: les lavages répétés par des solutions de NaCl hypotoniques, nécessaires à l'obtention de stromas dépourvus d'hémoglobine entraînant la désintégration des globules rouges et de la surface des stromas.

La deuxième hypothèse est défendue par les physiologistes qui ont montré que les échanges des gaz sanguins se font sans réaction chimique dans la membrane: il n'y aurait donc pas d'hémoglobine dans la membrane. Elle est soutenue également par les auteurs qui ont réussi à préparer des stromas dépourvus d'hémoglobine. Il faut citer HILLIER et HOFFMANN (38) PARPART (63) SCHRIER (85).

R. WEED (93) a préparé des stromas par la méthode de l'hémolyse successive qui lui a permis de soustraire 99,95 % de l'hémoglobine. L'étude de ces stromas a révélé:

- qu'ils possèdent une activité glucose 6 phosphate déhydrogénase et ATP indépendante de leur contenu en hémoglobine.
- qu'ils conservent la forme biconcave des globules rouges intacts.
- qu'ils conservent tout le cholestérol et les phospholipides des cellules dont ils dérivent.

- qu'ils conservent une réponse osmotique.

R. WEED conclue sur la base de ces résultats que l'hémoglobine n'est pas un composé structural essentiel de la membrane des globules rouges.

Au total, on peut admettre qu'une très faible proportion d'hémoglobine (moins de 0,05 %) est véritablement liée à la membrane: elle ne semble cependant pas jouer un rôle physiologique important ni constituer un élément essentiel de l'ultrastructure superficielle de l'hématie.

LA PREPARATION DE STROMAS DEPOURVUS D'HEMOGLOBINE.

Toutes les méthodes de préparation de stromas comportent évidemment une hémolyse des globules rouges. Cette hémolyse peut être provoquée de plusieurs façons:

- hémolyse osmotique: par l'eau distillée ou par des solutions salines hypotoniques.
- hémolyse physique: par congélation-décongélation, par l'action des ultrasons.
- hémolyse chimique: par l'utilisation de produits chimiques tels que la digitonine, la saponine, le toluène, l'éther.

On a décrit des méthodes de production de stromas pour chaque type d'hémolyse. Les plus importantes et les plus utilisées actuellement reposent sur l'hémolyse osmotique.

Le procédé le plus simple consiste à hémolyser les globules rouges par l'eau distillée: c'est un moyen brutal provoquant à coup sûr une rupture de la membrane ainsi que l'a montré David DANON (26). Cet auteur a filmé l'hémolyse des globules rouges sur lame en utilisant un échangeur d'ions (Amberlite) placé entre lame et lamelle. Cette résine échange les ions Na^+ et Cl^- contre les ions H^+ et OH^-, réduisant ainsi progressivement la concentration ionique du milieu environnant tout en maintenant un pH relativement constant. Le délai d'obtention de stromas varie en fonction de la concentration de la résine utilisée. Lorsque l'hémolyse est rapide, les hématies sont projetées d'un côté par la force de la réaction; quelquefois on observe pendant un court instant

avant la projection un renflement en un endroit donné de la membrane suivi d'une décharge d'une solution optiquement dense en ce point. Lorsque l'hémolyse est lente, la cellule devient d'abord sphérique et peu après l'hémoglobine est libérée dans toutes les directions et les stromas deviennent progressivement pâles à l'exception de leur bord. Donc, dans le cas d'une hémolyse lente, les cellules augmentent de volume, leur surface s'agrandit provoquant l'ouverture de "pores" qui laissent passer l'hémoglobine. Lorsque l'hémolyse est rapide, l'augmentation de volume est brutale et la membrane est rompue en un point.

HILLIER et HOFFMANN (38) ont proposé une méthode dite "d'hémolyse successive" qui soumet les globules rouges à une série de "chocs osmotiques" par lavages successifs dans des solutions de concentration décroissante. Par ce procédé ils ont apparemment obtenu des stromas intacts et libres d'hémoglobine et ont pu les étudier au microscope électronique. Leur méthode est basée sur les données suivantes; sous l'influence de la pression de l'eau qui pénètre par osmose, la membrane est étirée et ses propriétés sont altérées de sorte qu'elle devient perméable aux cations et à l'hémoglobine qui diffuse à l'extérieur de la cellule jusqu'à ce que l'équilibre osmotique soit réalisé; la membrane redevient alors imperméable à l'hémoglobine et aux cations. Ainsi une certaine quantité d'hémoglobine restera contenue dans la cellule après l'hémolyse initiale. Cependant d'autres quantités d'hémoglobine pourront être soustraites si la pression osmotique est augmentée à plusieurs reprises successives.

DANON, NEVO et MARIKOVSKY (25) ont amélioré la méthode de préparation en introduisant le phénomène de la dialyse qui permet de diminuer de façon continue et progressive la concentration saline du milieu environnant. Ils placent leur suspension de globules rouges dans un tube à dialyse suspendu dans un flacon d'Erlenmeyer. Entre les dialyses successives, les stromas sont lavés avec des solutions de ClNa de concentration équivalente aux différents hémolysats. La centrifugation de la suspension de stromas permettant de récupérer ceux-ci. Des stromas presque entièrement dépourvus d'hémoglobine peuvent ainsi être obtenus après deux ou trois centrifugations et resuspensions à condition de diluer suffisamment ces suspensions (1/40ème ou plus). Examinés entre lame et lamelle, au microscope à contraste de phase, à la fin de la dialyse, les stromas sont sphériques avec une membrane très fine et sont parfaitement clairs. Au microscope électronique, leur structure correspond à une fine membrane à surface granuleuse, ne contenant apparemment plus d'hémoglobine. On n'observe ni formes crénelées ni "cratères" chez les stromas préparés de cette façon. Ceci peut être rapporté au fait que les cellules ne sont soumises à aucun moment à un choc osmotique subit.

Rôle du pH et de la force ionique de la solution hémolysante sur le contenu en hémoglobine des stromas.

DANON, NEVO et MARIKOVSKY (25) dans leur étude sur la production de stromas par dialyse, soulèvent le problème de la

concentration optimale en NaCl du milieu de dialyse. Le maximum de l'hémolyse est atteint lorsque la concentration en NaCl de la solution entourant le tube à dialyse approche de la valeur 0,05 c'est à dire une concentration de 2,92 g pour mille. On peut donc utiliser comme solution de dialyse des solutions de concentration inférieure à 0,05 N. Plus la concentration est basse, plus l'hémolyse est rapide. Mais il n'est pas recommandé d'utiliser une solution dialysante de concentration inférieure à 0,015 N (0,87 g pour mille de NaCl) car il a été démontré que les stromas suspendus dans des solutions salines de très faible concentration subissent des modifications irréversibles. PONDER (77,78) en particulier, a observé la désintégration des globules rouges et de la surface des stromas dans les milieux de force ionique très basse.

L'étude précise des effets du pH et de la force ionique de la solution hémolysante sur le contenu en hémoglobine des stromas a été effectuée par DODGE, MITCHELL et HANAHAN (30). En effet, l'importance de ces deux facteurs n'avait pas été reconnue par la majorité des auteurs et leur méconnaissance paraît responsable des échecs dans la préparation de stromas dépourvus d'hémoglobine et par conséquent des résultats contradictoires obtenus ensuite dans l'étude de la composition chimique de ces stromas.

DODGE, MITCHELL et HANAHAN (30) ont utilisé des tampons de pH variable (8,0 ; 7,4 ; 6,8 ; 5,8) et de concentration variable (100, 80, 60, 40, 20, 10, 5 milliosmoles). Deux séries d'expérimentations ont été réalisées:

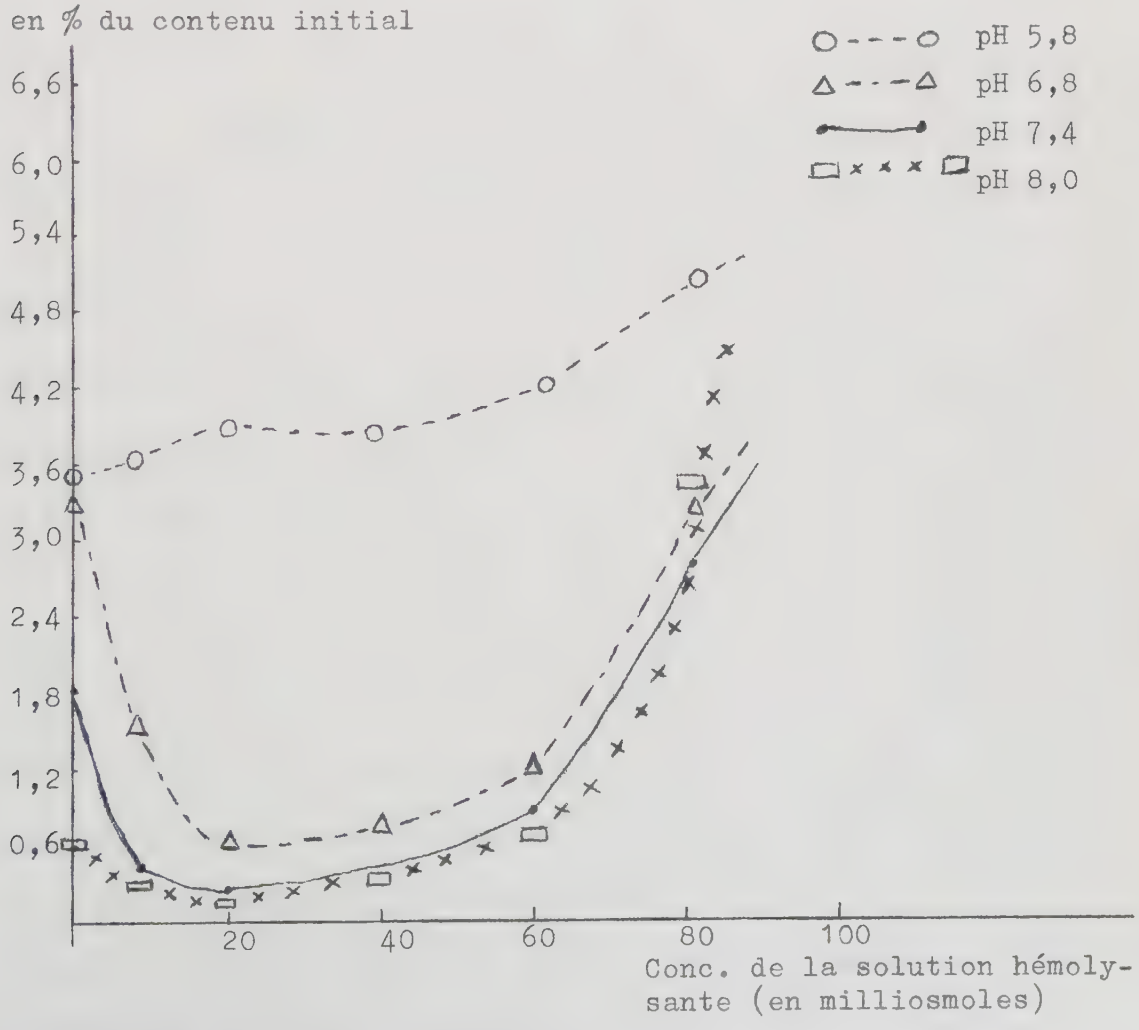
1° Hémolyse des globules rouges à pH constant en faisant varier la concentration.

2° Hémolyse à concentration constante et à pH variable.

Pour chaque expérience est déterminée: la numération des globules rouges, l'hématocrite, le contenu initial en hémoglobine.

L'hémoglobine des stromas est mesurée par la méthode à la pyridine.

Les résultats sont représentés dans la figure ci-dessous:



(DODGE, MITCHELL et HANAHAN 30)

La concentration du tampon influe de façon marquante sur la quantité d'hémoglobine soustraite. La soustraction maximale se produit à des concentrations entre 10 et 20 milliosmoles sauf à pH 5,8 où d'assez grandes quantités d'hémoglobine subsistent dans les stromas. A des pH de 7,4 et 8,0 et dans un tampon 20 milliosmolaire, les stromas obtenus sont dépourvus d'hémoglobine. Par contre, à un pH de l'ordre de 5,8, la liaison entre l'hémoglobine et les stromas est beaucoup plus forte. Il semble donc que l'hémolyse à pH 7,4 soit la procédure de choix.

Les auteurs ont observé au microscope à contraste de phase les stromas obtenus dans les diverses expériences. Les stromas dépourvus d'hémoglobine, préparés à pH 7,4 et dans un tampon 20 milliosmolaire sont homogènes et leur diamètre est égal à celui d'un globule rouge intact. Quelques particules sont visibles. Ceux préparés à pH 7,4 et dans un tampon 100 milliosmolaire sont hétérogènes: quelques uns ressemblent à des stromas sans hémoglobine, d'autres à des globules rouges intacts, d'autres enfin à des formes intermédiaires contenant encore de l'hémoglobine. Les stromas préparés dans de l'eau distillée sont plus minces que ceux préparés à des concentrations supérieures mais apparaissent plus hétérogènes: on observe de nombreux fragments, des stromas contractés et des formes myéliniques. Ceci confirme la tendance marquée de production de formes myéliniques lorsque les stromas sont préparés dans de l'eau distillée.

D'après ces auteurs, l'explication du rôle du pH pourrait être recherché dans l'influence des effets de charges électriques sur

le comportement de l'hémoglobine et de la membrane. La membrane du globule rouge a été assimilée à un polyanion. L'hémoglobine avec sa charge positive au-dessous de pH 6,8 serait fortement adsorbée sur la membrane chargée négativement. Au-dessus de pH 6,8 l'hémoglobine peut être supposée avoir moins d'affinité pour la membrane en raison d'une charge répulsive mutuelle.

PREPARATION DE STROMAS PAR DIALYSE DE GLOBULES ROUGES DANS UN REIN ARTIFICIEL.

Nous avons cherché à mettre au point une méthode permettant:

- de préparer des stromas entièrement dépourvus d'hémoglobine.
- de préparer des stromas en quantité importante.
- d'obtenir des stromas relativement intacts.

Les bases de notre technique de préparation reposent sur la méthode décrite par R. WEED (93): elle tient compte du rôle du pH et de la force ionique des solutions hémolysantes. Les modifications que nous avons apportées ont pour but de pouvoir préparer des stromas à partir d'une assez grande quantité de sang (300 à 350 ml). C'est ainsi que nous avons utilisé un rein artificiel pour dialyser les suspensions de globules rouges.

Le principe de la méthode est le suivant: les globules rouges sont mis en suspension dans une solution 200 milliosmolaire tamponnée à pH 7,2. Après dialyse contre une solution 20 milliosmolaire, les stromas sont lavés successivement dans une solution 60 milliosmolaire puis 30 milliosmolaire à pH 7,2.

Préparation des solutions et de la suspension globulaire.

Pour chaque préparation est utilisée une bouteille de sang frais (moins de 48 heures), contenant 300 à 350 ml de sang prélevé sur ACD. Après avoir décanté le plasma, les globules rouges sont lavés trois fois avec de l'eau physiologique tamponnée à pH 7,2. La couche leucocytaire est soigneusement éliminée

au cours de chaque décantation. On obtient un culot globulaire concentré dont on prélève un échantillon pour les déterminations suivantes: - numération des globules rouges

- hématocrite
- concentration en hémoglobine.

En vue de la dialyse, les globules rouges sont mis en suspension dans un tampon 200 milliosmolaire dont la composition est la suivante:

ClNa	0,06 M	soit	3,510 g
$PO^4HNa^2(12\ H^2O)$	0,025 M	soit	8,954 g
PO^4H^2K	0,008 M	soit	1,088 g
Eau distillée		qsp	1 litre.

On ajoute en outre:

- du Merseptyl à la dose de 1 pour 10 000 afin d'inhiber le développement de germes bactériens.
- du sel disodique de l'acide éthylène-diamine-tétraacétique (Na^2-EDTA ou Complexon III) à la concentration de $1.\ 10^{-3}$ M soit 0,372 g pour mille. L'EDTA a la propriété de former des complexes hydrosolubles très stables avec les ions métalliques polyvalents. R. WEED estime que l'adjonction de ce produit est importante et permet la soustraction complète de l'hémoglobine. Nous avons préparé récemment des lots de stromas sans ajouter d'EDTA aux solutions et les résultats ont été identiques. Nous pensons donc que l'adjonction d'EDTA n'est pas absolument nécessaire à l'obtention de stromas dépourvus d'hémoglobine.

Le pH de cette solution est de 7,2 mais il est contrôlé avant l'utilisation et éventuellement ajusté. Les solutions 60 et 30 milliosmolaires destinées au lavage des stromas sont obtenues par dilution appropriée d'une solution 200 milliosmolaire de base. Elles contiennent cependant du Merseptyl et de l'EDTA-Na^2 à la même concentration que la solution 200 milliosmolaire.

Toutes les solutions sont refroidies à +4° C.

Dialyse de la suspension de globules rouges.

50 ml de culot globulaire sont dissous dans deux litres de solution 200 milliosmolaire. Etant donné que nous utilisons le plus souvent 200 ml de culot globulaire, nous avons donc 8,2 litres à dialyser.

La dialyse est effectuée à l'aide d'un rein artificiel (appareil Usifroid). Le tube à dialyser (longueur: environ 20 mètres; largeur 16 mm) est enroulé autour d'un cylindre tournant à 8 tours/minute et dont la partie inférieure baigne dans environ 75 litres de solution 20 milliosmolaire à pH 7,2 refroidis à +2° C au départ. Le débit est règlé à 25-30 ml/minute.

L'hémolysat est recueilli dans des bouteilles stériles et maintenu à +4° C.

Centrifugation et lavages des stromas.

Pour la suite de la préparation nous avons utilisé successivement deux méthodes différentes, la deuxième nous donnant des résultats nettement meilleurs.

Méthode 1: L'hémolysat est centrifugé en chambre froide dans une centrifugeuse à débit continu SHARPLES type T1 comportant un bol

clarificateur type 24 B. La vitesse de rotation du bol est de 30 000 tours/minute (soit environ 22 000 g) et le débit de 8 litres/heure. Après ouverture du bol, on recueille les stromas sous forme d'une bouillie rosée. Ils sont immédiatement dissous dans un litre de solution 60 milliosmolaire. Après repos d'une nuit à +4° C, on effectue deux lavages des stromas avec la solution 60 milliosmolaire puis deux ou trois lavages avec la solution 30 milliosmolaire. Les centrifugations sont effectuées dans une centrifugeuse réfrigérée M.S.E. à 10 000 tours/minute pendant 20 minutes après les deux premiers lavages. Lorsque les stromas sont lavés avec la solution 30 milliosmolaire, le temps de centrifugation doit être de 30 minutes puisque les stromas deviennent en quelque sorte plus "légers" au fur et à mesure qu'ils perdent leur hémoglobine.

La suspension de stromas finale présente un aspect blanc opalescent quelquefois très légèrement rose s'il persiste un peu d'hémoglobine.

Le volume de la suspension finale est ramené en général à un volume double du volume initial du culot globulaire utilisé par addition d'eau distillée. (400 ml de suspension pour un culot globulaire de 200 ml).

Les stromas sont répartis dans des flacons de façon à avoir une quantité de stromas par flacon correspondant à 40 ml de culot globulaire. Les stromas sont congelés puis lyophilisés. Le produit lyophilisé se présente sous la forme d'un agglomérat parfaitement blanc.

Une partie de la suspension finale est conservée pour la détermination du poids sec et de l'hémoglobine résiduelle.

Méthode 2: Dès qu'il est recueilli, l'hémolysat est centrifugé dans une centrifugeuse réfrigérée SORVALL RC-2B comportant un rotor GSA ce qui permet de centrifuger à la fois 1500 ml d'hémolysat. La vitesse de centrifugation initiale est règlée à 10 500 tours/minute ce qui correspond à 18 000 g, ceci pendant 15 minutes. Les stromas recueillis sont immédiatement lavés dans du tampon 60 milliosmolaire. Après repos d'une nuit à +4° C, on effectue un deuxième lavage avec la solution 60 milliosmolaire puis deux ou trois lavages avec la solution 30 milliosmolaire. Au fur et à mesure des lavages, les stromas perdent leur hémoglobine et sont plus difficiles à sédimenter. Il faut donc augmenter la vitesse de centrifugation et le temps de centrifugation: 12 500 tours/minute (soit 25 000 g) pendant 30 minutes.

Finalement on obtient une suspension blanchâtre dont le volume est toujours ramené au double du volume du culot globulaire initial. Les stromas sont également répartis dans des flacons pour avoir toujours une quantité correspondant à 40 ml de culot globulaire initial par flacon.

Ainsi que l'attestent les chiffres donnés plus loin, la méthode 2 est beaucoup plus satisfaisante. Elle permet de récupérer des stromas en quantité plus importante pour un même volume de globules rouges au départ. La méthode 2 est également plus rapide, la préparation pouvant être terminée en 36 à 48 heures au lieu de 60 à 72 heures.

Remarques:

- Au cours des lavages des stromas on constate, après centrifugation, la présence d'amas grisâtres au fond des tubes de centrifugation. Ces dépôts sont éliminés; ils correspondent selon AZEN, ORR et SMITHIES (4) à des débris de leucocytes.
- Pendant toutes les phases de la préparation, la température des solutions et des suspensions de stromas est maintenue aux environs de +4° C. Ce maintien constant de la température nous parait constituer un facteur absolument indispensable à la réussite de la préparation. Il permet également de préserver les propriétés immunochimiques des stromas.

DOSAGE DE L'HEMOGLOBINE CONTENUE DANS LES STROMAS.

Trois sortes de méthodes pouvaient être envisagées:

1) Les méthodes ferrocolorimétriques: précises mais délicates. La présence éventuelle de Fer inorganique provenant du contact de l'hémolysat avec les parois métalliques du tube de la centrifugeuse (méthode 1) rendait par principe le dosage très difficile.

2) Le dosage spectrophotométrique décrit par PONDER (73): c'est une méthode micro-spectrophotométrique, nécessitant un matériel très spécial et dont l'exécution technique est difficile.

3) Les méthodes basées sur l'activité peroxydasique de l'hémoglobine:

à un pH déterminé (c'est à dire la propriété enzymatique que possède l'hémoglobine de catalyser l'oxydation de certains substrats à partir d'un peroxyde donateur tel que l'eau oxygénée). Cette activité enzymatique est caractéristique de l'hémoglobine et a été employée à l'origine très classiquement pour la recherche qualitative de l'hémoglobine. (test à la benzidine). Elle a fait ensuite l'objet d'applications quantitatives avec utilisation comme substrat de la Pyridine. Les avantages de ces méthodes sont: leur sensibilité extrême (la réaction peroxydasique est positive avec 5 microgrammes d'hémoglobine humaine) et leur lecture colorimétrique; elles permettent surtout de doser spécifiquement l'hémoglobine.
La méthode à la pyridine a été utilisée par DODGE, MITCHELL et HANAHAN dans leur étude sur la préparation et les caracté-

ristiques chimiques de stromas de globules rouges humains dépourvus d'hémoglobine. R. WEED utilise une méthode à la benzidine. La technique que nous avons adoptée est celle décrite par B. ANTOINE et J.R. CLAUDE (3). C'est une modification de la méthode de STORCK et ARDRY (88). Son principe est le suivant: en milieu alcoolo-acéto-pyridinique, l'hémoglobine oxyde deux substrats (pyramidon et résorcine) en présence de peroxyde d'hydrogène en développant une coloration rouge: cette coloration est extraite par un solvant (phénol saturé d'eau) et mesurée au spectrophotomètre à 500 millimicrons après addition d'acétone. On effectue un étalonnage préalable par un sang dont le taux d'hémoglobine a été déterminé.

Nous avons observé que la densité optique de la coloration n'était proportionnelle au taux d'hémoglobine que dans les limites comprises entre 0 et 60 microgrammes d'hémoglobine par ml. Toutes nos valeurs se situent cependant au dessous de 50 microgrammes d'hémoglobine par ml. La teneur en hémoglobine a été déterminée le plus souvent sur des stromas lyophilisés remis en solution et homogénéisés. Les chiffres donnés correspondent à la concentration en hémoglobine de la suspension de stromas ramenée au volume du culot globulaire initial.

Dans certains cas nous avons effectué des dosages comparatifs sur les stromas lyophilisés et sur la suspension correspondante de stromas conservés par congélation à -30° C. Le taux d'hémoglobine des stromas conservés par lyophilisation n'est pas inférieur au taux d'hémoglobine des stromas conservés par congélation. La

La lyophilisation ne semble donc pas altérér l'activité peroxydasique de l'hémoglobine. Nous avons également, pour deux préparations, effectué un dosage comparatif de l'hémoglobine par une méthode utilisant la benzidine. Le taux d'hémoglobine trouvé par les deux méthodes a été identique.

DETERMINATION DU POIDS SEC DES GLOBULES ROUGES ET DES STROMAS:

Un échantillon du culot globulaire initial (1ml) et de la suspension finale de stromas (5ml) sont séchés dans des pèse-filtres à l'étuve à 80°C. pendant 48 à 72 heures jusqu'à ce que le poids ne varie plus. Les pesées sont effectuées sur une balance de précision (1/10° de mg) les pèse-filtres étant placés dans un dessicateur à leur sortie de l'étuve jusqu'à refroidissement.

R E S U L T A T S

Les résultats de la préparation de stromas par la méthode que nous avons décrite sont rassemblés dans les différents tableaux donnés plus loin. Ces résultats concernent:

1) Le poids sec des stromas: il nous indique la quantité de matériel (stromas) récupérée comparé au matériel de départ (globules rouges). Il est exprimé sous deux formes:
   A) Poids sec des stromas en grammes pour 100 ml de globules rouges.
   B) Poids sec des stromas en grammes par gramme de globules rouges secs, c'est à dire $\frac{\text{Poids sec des stromas (g)}}{\text{Poids sec des globules rouges (g)}}$
2) Le contenu en hémoglobine des stromas: nous donnons les quatre valeurs suivantes:
   A) Concentration en hémoglobine (en g pour 100 ml) du culot globulaire initial.
   B) Concentration en hémoglobine (en mg pour 100 ml) de la suspension de stromas ramenée au volume du culot globulaire initial.
   C) Taux de l'hémoglobine résiduelle exprimé en % par rapport au contenu initial, c'est à dire
   $$\frac{\text{Conc. en Hb des stromas}}{\text{Conc. en Hb des globules rouges}} \times 100$$
   D) Taux de l'hémoglobine résiduelle exprimé par rapport au poids sec des stromas, c'est à dire
   $$\frac{\text{Poids de l'Hb contenu dans les stromas}}{\text{Poids sec des stromas}} \times 100$$

Les résultats de la préparation par la méthode 1 sont donnés dans les tableaux I et III, ceux de la méthode 2 dans les tableaux II et IV.

Le tableau V résumera les résultats de la préparation pour les deux méthodes en indiquant la moyenne des chiffres principaux suivie de la valeur de l'écart type ($M \pm \sigma$).

Tableau I: Poids sec des stromas préparés par la méthode 1.

Date de la préparation	Groupe	Age	Sexe	Poids sec des stromas (g)	
				pour 100 ml de globules rouges	par gramme de globules rouges secs
16.1.67	A_1+(D)	40	M	0,97	0,028
23.1.67	B +	37	M	0,93	0,027
30.1,67	B +	55	M	0,96	0,028
6.2.67	A_1+	33	M	0,95	0,029
20.2.67	B +	56	M	0,81	0,024
27.2.67	B +	40	M	0,93	0,028
6.3.67	B +	54	M	0,76	0,022
13.3.67	B +	45	F	0,82	0,024
3.4.67	B +	62	F	0,82	0,027
10.4.67	A_1+	59	F	0,74	0,022

Tableau II: Poids sec des stromas préparés par la méthode 2.

Date de la préparation	Groupe	Age	Sexe	Poids sec des stromas (g)	
				pour 100 ml de globules rouges	par gramme de globules rouges secs
16. 5.67	O +(D)	22	M	1,25	0,039
29. 5.67	O +	53	M	1,06	0,037
5. 6.67	O +	24	M	1,24	0,036
21. 6.67	O +	45	M	1,29	0,039
3. 7.67	A_1+	34	M	1,30	0,040
10. 7.67	A_1+	31	M	1,39	0,043
17. 7.67	O +	38	M	1,39	0,042
4. 9.67	A_1+	29	M	1,34	0,039
15.11.67	A_1+	23	M	1,36	0,039
22.11.67	A_1+	24	M	1,25	0,042

Tableau III: Contenu en hémoglobine des stromas préparés par la méthode 1.

Date de la préparation	Conc. en hémoglobine du culot globulaire initial (g pour 100) (A)	Conc. en hémoglobine de la suspension de stromas ramenée au volume du culot globulaire initial. (mg p. 100 ml) (B)	Hémoglobine résiduelle	
			en % par rapport au contenu initial (C)	par rapport au poids sec des stromas (%) (D)
16.1.67	23	4,8	0,021	0,59
23.1.67	21,6	3,1	0,014	0,42
30.1.67	21,7	4,8	0,022	0,66
6.2.67	25,1	4,1	0,016	0,48
20.2.67	21,4	1,7	0,008	0,41
27.2.67	21,6	2,8	0,013	0,59
13.3.67	25,1	2,0	0,008	0,42
3.4.67	20	2,0	0,010	0,32
10.4.67	23,2	2,4	0,010	0,57

Tableau IV: Contenu en hémoglobine des stromas préparés par la méthode 2.

Date de la préparation	(A)	(B)	(C)	(D)
16. 5.67	22,7	3,0	0,013	0,29
29. 5.67	21,7	2,0	0,009	0,20
5. 6.67	23,6	2,8	0,012	0,28
21. 6.67	21,4	2,7	0,013	0,27
10. 7.67	22,4	3,9	0,017	0,34
4. 9.67	22,4	2,7	0,012	0,28
22.11.67	20,5	4,3	0,021	0,46

Tableau V: Résumé des résultats et moyenne des principales valeurs.

Méthode de préparation	Poids sec des stromas (g)		Hémoglobine résiduelle par rapport au contenu initial (%)	Hémoglobine résiduelle par rapport au poids sec des stromas (%)
	pour 100 ml de globules rouges	par gramme de globules rouges secs		
Méthode 1	0,87 ± 0,08	0,026 ± 0,003	0,013 ± 0,005	0,50 ± 0,10
Méthode 2	1,29 ± 0,10	0,040 ± 0,002	0,014 ± 0,004	0,30 ± 0,07

Les résultats donnés dans ce tableau indiquent clairement que la méthode 2 permet de "récupérer" des stromas en plus grande quantité.

Les résultats plus faibles de la première méthode nous paraissent dus en grande partie à la centrifugation de l'hémolysat dans un dispositif de centrifugation continue. Le débit trop important (8 litres par heure) de la centrifugeuse utilisée ne permet pas de sédimenter tous les stromas dont un tiers environ est perdu.

L'hémoglobine résiduelle est exprimée de deux façons:

1) Hémoglobine résiduelle par rapport au contenu initial en hémoglobine du culot globulaire: c'est à dire nous comparons le taux de l'hémoglobine de la suspension de stromas au taux d'hémoglobine du même volume de culot globulaire initial: dans les deux méthodes plus de 99,98 % de l'hémoglobine a été soustraite aux globules rouges.
2) Hémoglobine résiduelle par rapport au poids sec des stromas: c'est à dire nous comparons le poids de l'hémoglobine résí-

duelle au poids sec des stromas. Pour le globule rouge entier l'hémoglobine représente 97 % du poids sec des globules.

Dans la méthode 1, l'hémoglobine résiduelle des stromas ne représente plus que 0,50 % du poids sec de ces stromas.

Dans la méthode 2, le poids sec étant nettement supérieur, l'hémoglobine résiduelle ne représente que 0,30 % du poids sec.

DISCUSSION ET COMPARAISON DES RESULTATS.

1) Contenu en hémoglobine des stromas.

Le tableau ci-dessous résume les principaux résultats donnés par différents auteurs concernant le taux d'hémoglobine résiduelle de leurs préparations de stromas:

Auteurs	Hémoglobine résiduelle	
	en % du contenu initial	par rapport au poids sec (%)
ANDERSON et TURNER (1)	3 %	45 à 58 %
BERNSTEIN et coll. (10)	-	10 à 30 %
WILLIAMS, ERICKSON et MACY(96)	-	23 %
PARPART (63)	0,01 %	-
WEED, REED et BERG (93)	0,05 %	1,4 %
DODGE, MITCHELL et HANAHAN(30)	0,01 %	0,2 %

Les résultats de notre méthode 2 sont voisins de ceux de DODGE, MITCHELL et HANAHAN qui sont les meilleurs que nous ayons trouvé dans la littérature.

2) Quantité de stromas obtenus.

Voici les chiffres que nous avons relevés:

- BERNSTEIN (10) estime que l'on peut obtenir 0,5 g de stromas blancs pour 100 ml de globules rouges.
- CALVIN et coll. (20): 1 à 2 g pour 250 ml de globules rouges.
- PARPART (63): 1 g pour cent du poids initial des globules rouges.

- WEED et coll. (93): 3 g pour cent du poids initial des globules rouges.

Selon PONDER (70), le stroma érythrocytaire représente 3,4 % du poids sec initial. Dans notre deuxième méthode, le poids sec des stromas est de 0,040 g± 0,002 par gramme de globules rouges secs soit environ 4 % du poids sec initial. Nous devons appliquer à cette valeur un facteur de correction: en effet, nos stromas ne sont pas lavés dans de l'eau distillée mais dans un tampon (30 milliosmolaire) qui contient encore une faible quantité de sels. De ce fait nos stromas représentent 3,5 % du poids sec initial des globules rouges, donc une valeur proche de celle indiquée par PONDER.

3) Observation des stromas au microscope à fond noir.

Les stromas d'une suspension fraîchement préparée se présentent sous forme d'une fine membrane sans contenu; la majorité des stromas paraît intacte mais on observe également la présence de fragments. Il est, par coséquent, impossible de faire une numération et de savoir combien de stromas ont été récupérés ou perdus.

Le dosage des lipides des stromas et des globules rouges permettrait d'apprécier les pertes en cours de préparation. Etant donné que nos stromas représentent au moins 3,5 % du poids sec initial des globules rouges (méthode 2) nous pouvons estimer que ces pertes sont minimes.

4) Conservation des stromas.

Les stromas lyophilisés sont conservés au réfrigérateur à +4°C. Leur aspect blanc reste inchangé pendant au moins un an.

Ils conservent leurs propriétés immunochimiques pendant ce délai, en particulier leur pouvoir d'absorber spécifiquement un anticorps correspondant.

C O N C L U S I O N S

Nous avons décrit une méthode permettant de préparer des stromas de globules rouges humains presque totalement dépourvus d'hémoglobine.

99,98 à 99,99 % du contenu initial en hémoglobine peut être soustrait aux globules rouges.

Dans l'ensemble, nos résultats sont comparables aux meilleurs résultats relevés dans la littérature tant en ce qui concerne le pourcentage de l'hémoglobine résiduelle que la quantité de stromas recueillie. Le grand intérêt de la méthode réside dans le fait de pouvoir préparer des stromas à partir d'une assez grande quantité de sang.

Les stromas obtenus constituent un matériel très valable en vue de l'étude de leur constitution chimique ou de leurs propriétés immunologiques.

VU

Strasbourg, le 13 février 1968

Le Président de thèse

R. WAITZ

VU et APPROUVE

Strasbourg, le 14 février 1968

Le Doyen de la Faculté de Médecine

J. CLAVERT

B I B L I O G R A P H I E

1. ANDERSON, H.M., TURNER, J.C. (1959)

Preparation and the haemoglobin content of red cell ghosts.

Nature, 183, p. 112-113

2. ANDERSON, H.M., TURNER, J.C. (1960)

Relation of haemoglobin to the red cell membrane.

J.clin. Invest. 39, p. 1-7.

3. ANTOINE, B., CLAUDE, J.R. (1964)

L'appréciation de la quantité de sang contenue dans un homogénéisat tissulaire.

Path. Biol. 12, 3-4, p. 198-205.

4. AZEN, E.A., ORR, S., SMITHIES, O. (1965)

Starch gel electrophoresis of erythrocyte stroma.

J. lab. clin. Med,65, p. 440-449.

5. AZEN, E.A., NAZHAT, R.A., SMITHIES, O. (1965)

Acidic buffer systems for urea starch gel electrophoresis.

J. lab. clin. Med,67, p. 650-659.

6. BALLANTINE, R. (1944)

Stromatin

J. cell. comp. Physiol, 23, p. 21-26.

7. BARTLETT, G.R. (1958)

Organization of red cell glycolytic enzymes: Cell coat phosphorus transfer.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 75, p. 110-114.

8. BEHREND, M.D. (1957)

Chemistry of Erythrocytes.

C.C. Thomas Publ. 227pp. Springfield Illinois U.S.A.

9. BELKIN, R., WIENER, A.S. (1944)

Demonstration of the propertus A, B, M, N, and Rh in red cell stromata.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 56, p. 214-217.

10. BERNSTEIN, S.S., JONES, R.L.,ERICKSON, B.N., WILLIAMS, H.H., AVRIN, I., MACY, I.G. (1938)

A method for the preparation of post hemolytic residue or stroma of erythrocytes.

J. biol. Chem. 112, p. 507

11. BESSIS, M. (1950)

La membrane des globules rouges et les hématies en fuseaux.

Compt. rend. Soc. Biol. 144, p. 79-81.

12. BESSIS, M., BRICKA, M. (1950)

Etudes au microscope électronique sur l'hémolyse, l'agglutination, la forme et la structure des globules rouges.

Revue d'Hématologie, 5, p. 396-427.

13. BESSIS, M., BRICKA, M., BRETON-GORIUS, J., TABUIS, J. (1954)

New observations on sickle cells with special reference to their agglutinability.

Blood, 9, p. 39-45.

14. BESSIS, M., DUPUY, A. (1951)

Examen au microscope électronique de la surface des globules rouges: Origine des hématexodies.

Compt. rend. Soc. Biol. 145, p. 1509.

15. BESSIS, M. (1961)

Certains aspects morphologiques de l'hémolyse: les figures myéliniques des globules rouges.

in Hämolyse und Hämolytische Erkrankungen, Siebentes Freiburger Symposium. p. 3-13.

Springer Verlag Berlin - Göttingen - Heidelberg.

16. BISHOP, C., SURGENOR, D.M. (1964)

The Red Blood Cell.

566 pp. Academic Press New York - London.

17. BRUN, G.C. (1939)

Cholesterol content of red blood cells in man.

Acta med. scand. suppl. 99, p. 1-237.

18. BUNDHAM, S., WRIGHT, C.S. (1953)

A clinical and experimental study of the erythrocyte surface ultrastructure with the electron microscope.

J. clin. Invest. 32, p. 979-990.

19. CAFFREY, R.W., TREMBLAY, R., GABRIO, B.W., HUENNEKENS, F.M. (1956)

Erythrocyte metabolism. II. Adenosinetriphosphatase.

J. biol. Chem. 223, p. 1-8.

20. CALVIN, M., EVANS, R.S., BEHREND, V., CALVIN, G. (1946)

Rh antigen and hapten. Nature of antigen and its isolation from erythrocyte stroma.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 61, p. 416-419.

21. CLARKSON, E.M., MAIZELS, M. (1952)

Distribution of phosphatases in human erythrocytes.

J. Physiol. 116, p. 112-128.

22. COOK, G.M.W. (1962)

Linkage of sialic acid in the human erythrocyte ultrastructure.

Nature, Lond. 195, p. 159-161.

23. COOK, G.M.W., HEARD, D.H., SEAMAN, G.V.F. (1961)

Sialic acids and the electrokinetic charge of the human erythrocyte membrane.

Nature, Lond. 191, p. 44-47.

24. DANDLIKER, W.B., MOSKOWITZ, M., ZIMM, B.H., CALVIN, M. (1950)

The physical properties of elinin, a lipoprotéin from human erythrocytes.

J. amer. chem. Soc. 72, p. 5587-5592.

25. DANON, D., NEVO, A., MARIKOVSKY, Y. (1956)

Preparation of erythrocyte ghosts by gradual haemolysis in hypotonic aqueous solutions.

Bull. Res. Coun. Israel, 6E, p. 36-39.

26. DANON, D. (1961)

Osmotic hemolysis by gradual decrease in the ionic strength of the surrounding medium.

J. cell. comp. Physiol. 57, p. 111-117.

27. DAWSON, R.M.C., HEMINGTON, M., LINDSAY, D.B. (1960)

The phospholipids of the erythrocyte ghosts of various species.

Biochem. J. 77, p. 226-230.

28. DE GIER, J., VAN DEENEN, L.M. (1961)

Some lipid characteristics of red cell membranes of different species.

Biochim. biophys. acta. 49, p. 286-296

29. DERVICHIAN, D.G. (1955)

Problèmes de structure, d'ultrastructure et de fonctions cellulaires.

Exposés actuels de Biologie cellulaire, Ch. IV, p. 103 Masson et Cie, édit. Paris.

30. DODGE, J.T., MITCHELL, C., HANAHAN, D.J. (1963)

The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes.

Arch. Bioch. Bioph. 100, p. 119-130

31. DOURMASHKIN, R.R., DOUGHERTY, R.M., HARRIS, R.J.C. (1962)

Electron microscopic observations on Rous sarcoma virus and red cell membranes.

Nature, Lond. 194, p. 1116-1119.

32. DOURMASHKIN, M.D., ROSSE, W.F. (1966).

Morphologic changes in the membranes of red blood cells undergoing hemolysis.

Amer. J. Med. 41, p. 699-710.

33. ERICKSON, B.N., WILLIAMS, H.H., BERNSTEIN, S.S., ARVIN, I., JONES, R.L., MACY, I.G. (1958)

The lipid distribution of post-hemolytic residues or stroma of erythrocytes.

J. biol. Chem. 122, p. 515-528.

34. EYLAR, E.H., MADOFF, M.A., BRODY, C.V., ONCLEY, J.L. (1962)

The contribution of sialic acid to the surface charge of the erythrocyte.

J. biol. Chem. 237, p. 1992-2000.

35. FARQUHAR, J.W. (1962)

Human erythrocyte phosphoglycerides. I. Quantification of plasmalogens, fatty acids and fatty aldehydes.

Biochim. Biophys. Acta, 60, p. 80-89.

36. HALLAUER, C. (1934)

Weitere Versuche zur Isolierung wasserlöslicher Gruppenstoffe aus menschlichen Erythrocyten.

Z. Immun. Forsch. 83, p. 114-123.

37. HEARD, D.H., SEAMAN, G.V.F. (1960)

The influence of pH and ionic strength on the electrokinetic stability of the human erythrocyte membrane.

J. gen. Physiol. 43, p. 635-654.

38. HILLIER, J., HOFFMANN, J.F. (1953)

On the ultrastructure of the plasma membrane as determined by the electron microscope.

J. cell. comp. Physiol. 42, p. 203-248.

39. HOFFMANN, J.F., (1958)

Physiological characteristics of human red blood cell ghosts.

J. gen. Physiol. 42, p. 9-28.

40. HOKIN, L.E., HOKIN, M.R. (1961)

Diglycéride kinase and phosphatidic acid phosphatase in erythrocyte membranes.

Nature, Lond. 149, p. 563.

41. JAMES, A.T., LOVELOCK, J.E., WEBB, J.P.W. (1959)

The lipids of whole blood. I. Lipid biosynthesis in human blood in vitro.

Biochem. J. 73, p. 106-115.

42. JORPES, E. (1932)

The protein component of the erythrocyte membrane or stroma.

Biochem. J. 26, p. 1488-1503

43. KABAT, E.A. (1956)

Blood group substances. Their chemistry and immunochemistry. 330 pp. Academic Press New York.

44. KATES, M., ALLISON, A.C., JAMES, A.T. (1961)

Phosphatides of human blood cells and the rôle in spherocytosis.

Biochim. Biophys. acta. 48, p. 571-582

45. KLENK, E., UHLENBRUCK, G. (1960)

Über neuraminsäurehaltige Mucoide aus Menschenerythrocytenstroma, ain Beitrag zur Chemie der Agglutinogene.

Z. physiol. Chem. 319, p. 151-160.

46. KOSCIELAK, J. (1965)

A B O Blood-group substances from erythrocytes as lipid antigens.

Bibl. haemat. 23, p.453-464.

47. LATTA, H. (1952)

The surface of the mammalian erythrocyte.

Blood, 7, p. 508-521.

48. LAUF, P.K., POULIK, M.D. (1967)

Structural integrity of acetylcholinesterase of human red cell membranes.

XV° Annual Colloquium BRUGES (mai 1967).

49. LOVELOCK, J.E. (1953)

The haemolysis of human red blood cells by freezing and thawing.

Biochim. biophys. Acta, 10, p. 414-426.

50. LOVELOCK, J.E. (1955)

The physical instability of human red blood cells.

Biochem. J. 60, p. 692-696.

51. MANDEL, P., CHAMBON, P., KARON, M., KULIC, I., DEPTER, M. (1960)

Nucléotides libres des globules rouges et des réticulocytes.

Folia haemat., Lpz. 78, p. 257-275.

52. MARINETTI, G.V., ERBLAND, J., STOTZ, E. (1958)

Phosphatides of pig heart fractions.

J. biol. Chem. 233, p. 562-565.

53. MITCHELL, C.D., MITCHELL, W.B., HANAHAN, D.J. (1965)

Enzyme and hemoglobin retention in human erythrocyte stroma.

Biochim. biophys. Acta. 104, p. 348-358.

54. MITCHISON, J.M. (1950)

Thickness and structure of the membrane of human red cell ghosts.

Nature, Lond. 166, p. 347.

55. MITCHISON, J.M. (1953)

A polarized light analysis of human red cell ghosts.

J. exp. Biol. 30, p. 397-432.

56. MORGAN, W.T.J. (1960)

A contribution to human biochemical genetics: the chemical basis of blood group specificity.

Proc. roy. Soc. London, Ser B, 151, p. 308-347.

57. MORGAN, T.E., HANAHAN, D.J. (1966)

Solubilization and characterization of a lipoprotein from erythrocyte stroma.

Biochemistry, 5, p. 1050-1059.

58. MOSKOWITZ, M., DANDLIKER, W.B., CALVIN, M., EVANS, R.S. (1950)

Studies on the antigens of human red cells. The separation from human erythrocytes of a water soluble fraction containing the Rh, A and B fractions.

J. Immunol. 65, p. 383-392.

59. MOSKOWITZ, M., CALVIN, M. (1952)

On the components and structure of the human red cell membrane.

Exptl. Cell Res. 3, p. 33-46.

60. MUNN, J.I. (1958)

Studies of lipids in human red cells.

Brit. J. Haemat. 4, p. 344-349.

61. MUNN, J.I., CROSBY, W.H. (1961)

Red cell lipids in various abnormalities of the human red cells.

Brit. J. Haemat. 7., p.523-528.

62. NOWOTNY, A. (1955)

Studies of the chemical structure of A, B and O blood group antigens.

Acta Physiol. Acad. Sci. Hungaricae, 7, p. 31-42.

63. PARPART, A.K. (1942)

The preparation of red cell membranes.

J. cell. comp. Physiol. 19, p. 248-249.

64. PARPART, A.K., DZIEMIAN, A.J. (1940)

The chemical composition of the red cell membrane.

Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. 8, p. 17-22.

65. PARPART, A.K., LORENTZ, P.B., PARPART, E.R., GREGG, J.R., CHASE, A.M.

The osmotic resistance (fragility) of human red cells (1947)

J. clin. Invest. 26, p. 636-640.

66. PARPART, A.K., BALLANTINE, R. (1952)

Molecular anatomy of the red cell plasma.

in Modern Trends in Physio logy and Biochemistry

pp. 135-148 E.S.G. Barron ed. Academic Press

New York

67. PEROSA, L., RACEUGLIA, G. (1952)

Researches on the chemical composition of the erythrocyte membrane.

Experientia, 8, p. 392.

68. PHILLIPS, G.B., ROOME, N.S. (1959)

Phospholipids of human red blood cells.

Proc. Soc. exp. Biol. N.Y. 100, p. 489-492.

69. PONDER, E. (1942)

On properties of the red cell ghost.

J. exp. Biol. 18, p. 257-265.

70. PONDER, E. (1948)

Hemolysis and related phenomena

Grune and Stratton New York.

71. PONDER, E. (1952)

Various types of ghosts derived from human red cells: heat fragmentation and phase optics studies.

J. exp. Biol. 29, p. 605-619.

72. PONDER, E. (1961)

The cell membrane and its properties.

in The Cell vol. II, p. 1-84 ed. Brachet, J. and Mirsky, A.E. London, Academic Press.

73. PONDER, E. (1960)

Détermination spectroscopique de l'hémoglobine résiduelle de stromas de globules rouges humains.

Revue d'Hématologie, 15, p. 411-416.

74. PONDER, E. (1960)

La structure et l'ultrastructure de l'hématie

Revue d'hématologie, 15, p. 489-509.

75. PONDER, E. (1962)

Structure du globule rouge.

Ann. Biol. clin. 3-4, p. 231-257

76. PONDER, E., BARRETO, D. (1956)

The birefringence of the human red cell ghosts.

J. gen. Physiol. 39, p. 319-324.

77. PONDER, E., PONDER, R.V. (1960)

Propriétés des stromas de globules rouges humains préparés par "hémolyse successive" dans des milieux de force ionique décroissante.

Revue d'Hématologie, 15, p. 282-285.

78. PONDER, E., PONDER, R.V. (1963)

Observations quantitatives sur la production de formes myéliniques par les stromas de globules rouges.

Nouv. Rev. franç. Hémat. 3, p. 553-558.

79. POST, R.L., MERRITT, C.R., KINSOLVING, C.R., ALBRIGHT, C.D. (1960)

Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human rythrocute.

J. biol. Chem. 235, p. 1796- 1802.

80. PRANKERD, T.A.J., ALTMANN, K.I., ANDERSON, J.R. (1954)

Electrophoresis of human red cell stroma.

Nature, Lond. 174, p. 1146.

81. PRANKERD, T.A.J. (1961)

The Red Cell. An account of its chemical physiology and pathology.

C.C. Thomas Publ. Springfield Illinois U.S.A.

82. RAMOT, B., ASHKENAZI, I., RIMON, A., ADAM, A., SHEBA, C. (1961)

Activation of a glucose 6 phosphate dehydrogenase of enzyme deficient subjects. II. Properties of the activator and the activation reaction.

J. clin. Invest. 40, p. 611-616.

83. REED, C.F., SWISHER, S.N., MARINETTI, G.V., EDEN, F.G. (1960)
Studies on the lipids of the erythrocyte. I. Quantitarive analysis on the lipids of normal human red blood cells.
J. lab. clin. Med. 56, p. 281-289.

84. SCHMITT, F.O., BEAR, R.S., PONDER, E. (1936)
Optical properties of the red cell membrane.
J. cell. comp. Physiol. 9, p. 89-92.

85. SCHRIER, S.L. (1963)
Studies of the metabolism of human erythrocyte membranes.
J. clin. Invest. 42, p. 756-766.

86. SCHRIER, S.L., DOAK, L.S. (1962)
Metabolism and membrane transport of erythrocyte stroma.
J. clin. Invest. 41, p. 1397-1398.

87. STERN, K.G., REINER, M., SILBER, R.H. (1945)
On the electrophoretic pattern of red blood cell proteins.
J. biol. Chem. 161, p. 731

88. STORCK, J., ARDRY, R. (1951)
Microdosage colorimétrique de l'hémoglobine dans les milieux biologiques.
Ann. Biol. clin. 9, p. 197-200.

89. TISHKOFF, G.H., ROBSCHEIT-ROBBINS, F.S., WHIPPLE, M.D. (1953)
Red cell stroma in Dogs. Variations in the stroma protein and lipid fractions related to experimental conditions.
Blood, 8, p. 459-468.

90. VAN DEENEN, L.L.M., DE GIER, J. (1964)

Chemical composition and metabolism of lipids in red cells of various animan species.

in The Red Blood Cell p. 243-307

Academic Press New York

91. WAITZ R. (1936)

Le phénomène d'expulsion de substance hors des hématies (hématexodies). Son étude expérimentale.

Ann. de Méd. 40, p. 413-439.

92. WAYS, P. HANAHAN, D.J. (1964)

Characterization and quantification of red cell lipids in normal man.

J. Lipid. Res. 5, p. 318-328.

93. WEED, R.I., REED, C.F., BERG, G. (1963)

Is hemoglobin an essential structural component of human erythrocyte membranes.

J. clin. Invest. 42, p. 581-588.

94. WEED, R.I., REED, C.F. (1966)

Membrane alterations leading to red cell destruction.

Am. J. Med. 41, p. 681-698.

95. WHITTAM, R. (1964)

Transport and diffusion in red blood cells.

pp. 12-36 Edward Arnold (Publishers) Ltd. Mondon.

96. WILLIAMS, H.H., ERICKSON, B.N., MACY, I.G. (1941)

Chemical structure of red blood cell.

Quart. Rev. Biol. 16, p. 80-89.

97. WOLPERS, C. (1956)

Elektronenmikroskopische Untersuchungen der Innenstrukturen kernloser Erythrocyten.

Klin. Wschr. 34, P. 61-69.

98. WOLPERS, C., ZWICKAU, K. (1942)

Zur Frage der Erythrocytenmembran.

Folia haemat. 65, p. 211-221.

99. YAMAKAWA, T., YOKOHAMA, S., HANDA, N. (1963)

Chemistry of lipids of posthemolytic residue or stroma of erythrocytes. XI. Structure of globoside, the main mucolipid of human erythrocytes. J. Biochem. (Tokyo) 53, p. 28-36.

T A B L E D E S M A T I E R E S

	Pages
INTRODUCTION	1
COMPOSITION CHIMIQUE DU STROMA ERYTHROCYTAIRE	2
- Composition lipidique	2
- Composition protidique	14
- Mucopolysaccharides	17
- Nucléotides libres	18
- Enzymes contenus dans les stromas	18
ULTRASTRUCTURE DU GLOBULE ROUGE	20
RELATION DE L'HEMOGLOBINE AVEC LA MEMBRANE	25
LA PREPARATION DE STROMAS DEPOURVUS D'HEMOGLOBINE	28
- Rôle du pH et de la force ionique de la solution hémolysante sur le contenu en hémoglobine des stromas	
PREPARATION DE STROMAS PAR DIALYSE DE GLOBULES ROUGES DANS UN REIN ARTIFICIEL	35
- Préparation des solutions	35
- Dialyse de la suspension de globules rouges	37
- Centrifugation et lavage des stromas	37
- Dosage de l'hémoglobine résiduelle	41
- Détermination du poids sec des globules rouges et des stromas	43
RESULTATS	44
DISCUSSION ET COMPARAISON DES RESULTATS	50
CONCLUSIONS	53
BIBLIOGRAPHIE	I à XV